

注 意 事 项

1. Cyt-B的配制 Cyt-B多用Sigma试剂公司的产品,实验前用二甲基亚砜(DMSO)配成2 mg/ml的原液,按每次用量分装保存于-70℃左右(-40°至-80℃)的低温冰箱中。Cyt-B的贮存与实验过程中应注意避光。根据我们的经验,原液贮存过程中效价下降,至3个月已很明显,故应及时使用。

2. 获得分散良好、染色清晰的完整淋巴细胞制片,对准确计数微核至关重要。根据我们实验室的多年实践,目前报告的方法欠理想,最近我们建立的低渗、中止、减少固定液中冰

醋酸用量的改良制片法,结果尚称满意^[4,7]。

参 考 文 献

- [1] Fenech, M. et al., 1985, *Mutat Res.*, 147: 29.
- [2] Fenech, M. et al., 1986, *Mutat Res.*, 161: 193.
- [3] Kormos, C. et al., 1988, *Mutat Res.*, 199: 31.
- [4] Xue, KX. (薛开先) et al., 1991, *J Chinese Genet.*, (in press).
- [5] Krishna, G. et al., 1989, *Mutat Res.*, 222: 63.
- [6] Erexson, GL. et al., 1987, *Mutat Res.*, 178: 117.
- [7] 马国建等, 1989, *细胞生物学杂志*, 11: 143.

新生大鼠顶盖脑组织提取液的高效液相色谱分析

周明华 林斯骏 吴玺印 邱鹏新

(香港大学医学院解剖学系)

任麟孙

(香港中文大学医学院解剖学系)

最近 Barde 指出,在培养中神经元迅速死亡的原因之一,是该神经元得不到靶组织提供的诱向因子(trophic factor)^[1]。作者的实验清楚表明,在培养初生大鼠的视网膜神经细胞中,加有一定的顶盖提取液,其神经细胞活跃生长、胞体增大^[2,3],提示此提取液是有生物活性的。前不久作者曾对顶盖提取液进行了电泳分离^[4],并用以直接培养视网膜神经细胞,再次显示出它的生物效应^[5]。为此,我们采用分离微量生物大分子蛋白质的有效方法^[6,7]的高

效液相色谱法(HRLC)*,来分析顶盖脑组织提取液的生物大分子。

材 料 与 方 法

1. 仪器 Bio-Red 700 型高效液相色谱仪(HRLC 美国); Bio-Rad 1306 型 UV 检测器,波长 280 nm; Bio-Sil SEC-125 分子筛层析柱(规格见下表)和 Bio-Sil SEC 保护柱 75×7.5 mm。新一代 HRLC 用钛替代了不锈钢,在溶剂传送管道中用氟化多聚物(fluoropolymer)抗腐蚀;并用二氧化硅代替树脂。这样使仪

Bio-Sil SEC-125 柱的性能

长度(mm)	粒度(μm)	孔径(nm)	分离蛋白范围(D)	负荷样品(mg)	标准流速 ml/min	pH
600×7.5	10±2	12.5	5000—100000	0.001—1.5	1.0	2—7

Bio-Sil SEC-125 柱和 Bio-Sil SEC 保护柱系日本国产

本研究由香港大学、医学院、裘槎 3600310792 和 UPGC 221400030 等基金资助。

* HRLC 系 High Resolution Liquid Chromatography 的缩写,是新一代的 HPLC,由美国 Bio-Rad 公司赞助,谨表衷心感谢。

器可以承受压力达 4000 psi, 提高工效 10—20 倍。

2. LMW 标准蛋白(Pharmacia, 瑞典), 用分离标准蛋白混合液(含牛血清白蛋白 67 KD, 卵白蛋白 43 KD, 碳酸酐酶 30 KD 和黄豆胰蛋白酶抑制剂 20.1 KD)和单一卵白蛋白 45 KD、碳酸酐酶 29 KD (Sigma, 美国), 以标准蛋白质来确定样品分子量。

洗脱液 0.1 mol/L Na_2SO_4 和 0.02 mol/L NaH_2PO_4 , pH 6.8。顶盖提取液的制备见前文^[3,4]。每次在仪器启动 10 分钟后注入 20 μl 样品。

流速为 1.0 ml/min, 0.25 ml/min 和 0.15 ml/min, 实验环境温度为室温。

结果与讨论

HRLC 是新一代的 HPLC, 被誉为分离和纯化微量生物大分子蛋白的有效方法。在实验时先用洗脱液洗脱, 待 UV 检测器显示为 0.00 时始注入 20 μl 顶盖提取液。

表 1 各蛋白出峰保留时间(min)

标准蛋白分子量 (KD)		流速(ml/min)		
		1.0	0.25	0.15
Sigma				
碳酸酐酶	(29)	20.07	80.97	133.76
卵白蛋白	(45)	18.39	74.19	122.61
Pharmacia				
牛血清蛋白	(67)	16.73	64.63	106.10
卵白蛋白	(43)	18.21	70.27	115.51
碳酸酐酶	(30)	20.38	78.38	128.93
黄豆胰蛋白酶抑制剂	(20.1)	20.87	80.62	132.67

1. 对标准蛋白出峰保留时间的检测, 从表 1 可以看出在流速为 1.0 ml/min, 0.25 ml/min 和 0.15 ml/min 时, (Sigma)碳酸酐酶 29 KD 的出峰保留时间分别为 20.07、80.97 和 133.76 分钟; (Sigma)卵白蛋白 45 KD 的出峰保留时间分别为 18.39、74.19 和 122.61 分钟(图 I、II)。此结果显示, 当流速成一定比例地减低时, 各单一标准蛋白的出峰保留时间相应地按一定比例延迟。如碳酸酐酶当流速减低约 75% 和 85% 时, 其出峰保留时间相应地也延长约 75% 和 85% 的时间, 说明彼此是成平行的正比关系。在同样的流速下, Pharmacia 的

混合标准蛋白层析分离的结果, 同样的, 随流速按一定比例地减低, 各蛋白质层析峰的保留时间也相应地延迟(图 III、表 1)。以上结果表明 HRLC 仪器, 色谱条件和结果均是稳定的。

2. 对顶盖提取液蛋白出峰保留时间的检测, 为使顶盖提取液能够有效地层析分离各不同分子量的蛋白质分子, 同时便于和标准蛋白质层析曲线相比较, 本实验选用与检测标准蛋白质完全相同的实验条件。从表 2 和图 IV 可以清楚地看出, 当流速为 0.15 ml/min 时, 顶盖提取液有 12 个蛋白质层析峰, 它们的出峰保留时间依次为 74.44、79.34、93.81、102.76、

表 2 顶盖提取液各蛋白的出峰保留时间、面积和分子量

峰序号	出峰保留时间	面积(%)	分子量(KD)
1	74.44	2.72	210
2	79.34	20.97	107.5
3	93.81	3.81	100.5
4	102.76	3.60	74
5	110.30	7.43	54.6
6	116.13	2.70	44
7	122.52	1.04	34.3
8	129.92	1.80	26.3
9	135.97	0.01	21
10	159.16	33.99	8.35
11	172.68	19.95	5
12	197.96	1.98	2

110.3、116.13、122.52、129.92、135.97、159.16、172.68 和 197.96 分钟。各蛋白质峰面积的百分比分别为 2.72、20.97、3.81、3.60、7.43、2.70、10.4、1.80、0.01、33.99、19.95 和 1.98%, 其中有 3 个蛋白质峰的面积在 20% 以上, 它们是 19.95、20.97 和 33.99%。考虑到顶盖提取液是含有多种蛋白质分子的混合液, 在蛋白质分子之间彼此有相互作用, 而多种蛋白质分子和单一蛋白质分子在一定容量中的浓度也有差别, 这些都将在选定的流速中加快多种蛋白分子出峰保留时间(见图 V)。因此, 我们选用 Pharmacia 标准蛋白质混合液的层析曲线为标准, 来推算顶盖提取液的多种蛋白质分子量的范围。它们介于 210 kD 和 2 kD 之

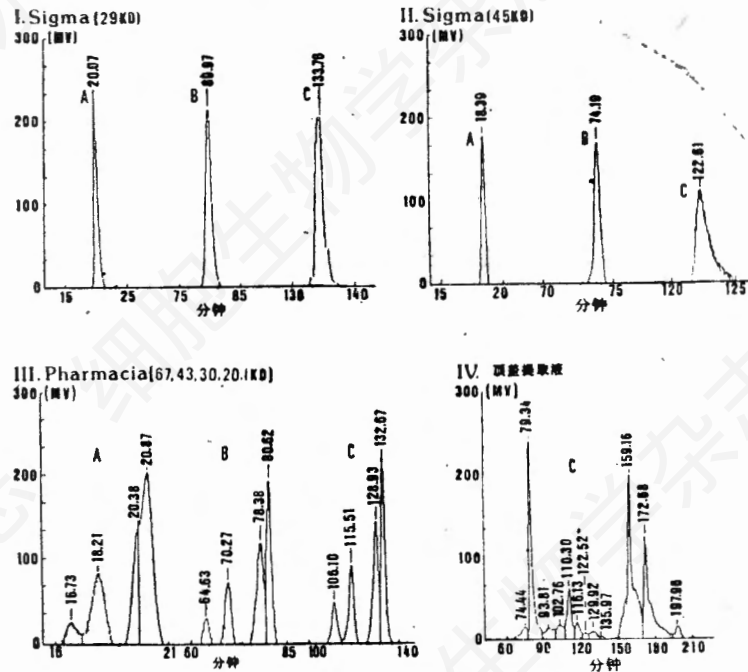


图 I、II、III 和 IV，标准蛋白和顶盖提取液的高效液相层析图谱
I、II 和 III，各标准蛋白在流速 1.0 ml/min(A) 0.25 ml/min(B) 和 0.15 ml/min(C) 的出峰保留时间(分钟)；IV 顶盖提取液在流速 0.15 ml/min(C) 的出峰保留时间(分钟)。

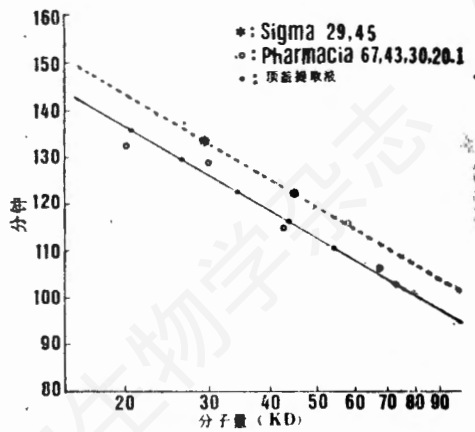


图 V 顶盖提取液和标准蛋白的层析峰与分子量图

间，依次相当于 210、107.5、100.5、74、54.6、44、34.3、26.3、21、8.35、5 和 2 KD，其中分子量在 74 KD 和 21 KD 范围之间的蛋白质分子在 Bio-Sil SEC-125 柱性能范围之内，所以可靠性是较高的(图 V)。作者最近报道的顶盖提取液电泳的 30 KD 蛋白质带，对培养中视网膜节细胞的存活和生长具有特异的促进作

用^[6]。如果参照 Pharmacia 标准蛋白质层析直线曲线，推测约在 126.20 分钟时可以收集到这种 30 KD 神经细胞诱导因子。另外，在其他两个流速下顶盖提取液分别出现 8 个(1.0 ml/min)和 22 个(0.25 ml/min)蛋白质层析峰。

摘要

作者用 HRLC 层析分离新生大鼠顶盖提取液，在 0.15 ml/min 流速时，有 12 个蛋白质层析峰。以 Pharmacia 标准蛋白质混合液层析曲线为标准，推算顶盖提取液蛋白质分子量介于 210 kD 和 2 kD 范围之内，其中在 74 kD 和 21 kD 范围之间的蛋白质在分子筛层析柱性能范围之内，提示有较高的可靠性。并推测在 126.20 分钟处可能收集到 30 kD 神经细胞诱导因子。

参考文献

[1] Barde Y. A., 1988, TINS, 11: 343-346.
[2] 周明华和赵丽萍, 1990, 解剖学报, 21: 198-201.

- [3] 周华明和赵丽萍, 1990, 解剖学报(印刷中)
 [4] 周明华等, 1990, 细胞生物学杂志, 12(3): 140—143。
 [5] 周明华等, 1990, 中国科学(待发表)。

- [6] Huebner F. R. 和 Bietz J. A., 1984, *Cereal Chem.*, 61: 544.
 [7] Kurkawa M 和 Macleod M. C., 1985, *Anal Biochem.*, 144: 47.

大鼠肝细胞的分离技术

黄俊勇 冷欣夫

(北京中国科学院动物研究所)

离体的大鼠原代肝细胞, 作为可溶性酶与组织之间、整体动物与离体肝脏之间的一种中介的实验模型, 越来越多地被应用于生化毒理学、药理学和环境毒理学等学科领域^[1-6]。

早先人们用机械方法, 随后 Jacob 等^[7], Rappaport 等^[8]用 Ca^{2+} 离子或 K^{+} 离子的螯合剂灌注肝脏的方法来分离肝细胞, 但成活率都不高。Howard 等^[9]在灌注技术中引进了胶原酶和透明质酸酶作为肝脏结缔组织的消化酶后, 分离的肝细胞成活率有了较大的提高。这一方法 Berry 和 Friend^[10]作了改进, 采用循环灌注技术, Wagle 等^[11]则进一步将实验简化为只用胶原酶并改用无 Ca^{2+} 离子的缓冲液系统, Seglen^[12]在此基础上缩短灌注时间, 进一步提高了分离的细胞成活率。Fry 等^[13]将剪碎的肝脏直接用消化酶处理来分离肝细胞, 但这种方法细胞产率和成活率都较低, 一般只适用于活组织检查等不需灌注的试验。Nakatsugawa 等^[14], 冷欣夫等^[15]在分离肝细胞中用含胶原酶的 Hanks' 溶液灌注大鼠肝脏, 也得到较为满意的结果。

我们在前人的技术基础上, 进一步改进和完善了采用含胶原酶的无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子的 Hanks' 溶液灌注大鼠肝脏分离肝细胞的方法, 分离得到的肝细胞成活率达 96% 左右, 且细胞产率较高。现将试验情况分述如下:

材料

本试验所用的主要试剂中胶原酶 (Type II)、牛

血清蛋白 (BSA) 为 Sigama 公司产品, Waymouth MB 752/1 培养基为美国 GIBCO 公司产品, 其他试剂均为国产分析纯。本试验中所用 Hanks' 溶液均为无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子溶液, 由混合气体 (95% O_2 , 5% CO_2) 饱和后, 调 pH 至 7.2—7.4, 并经无菌过滤器过滤。肝细胞分离过程中, 向缓冲液中通气, 一律指在溶液的液面上方维持通气。

试验中用的器皿、用具可因不同的试验要求进行不同程度的消毒灭菌。本文试验中的器皿、用具是用 75% 酒精消毒灭菌。

雄性大鼠 (Sprague-Dawley 品系) 150—200 g, 由本所饲养场提供。

方法

一、动物的麻醉及解剖 将大鼠置于密闭的容器内, 用乙醚麻醉。其程度一般等大鼠四肢瘫软, 由轻度的急促呼吸刚进入深呼吸即可, 约需 2 分钟, 但因鼠的个体差异和乙醚用量而有些差异。然后将大鼠固定在蜡盘上, 整个腹部用 75% 酒精消毒后, 沿腹中线用骨剪打开腹腔至胸膈膜的胸骨突起处, 小心避免损伤肝脏和隔膜。两侧腹部皮肤从尾部向胸部各剪一“V”形, 分开固定于前肢近傍。使腹腔完全暴露。将内脏翻移至鼠体的左侧, 暴露肝门静脉和后腔静脉。将肝门静脉离肝脏入口处 1—1.5 cm 处以及后腔静脉近肾静脉分支部位与周围组织分离开, 各穿一根棉纱线备用。并经由后腔静脉注射 0.06% 肝素钠生理盐水溶液 0.5—0.6 ml, 注射点尽量靠后。

二、静脉插管和灌注 将静脉插管沿去除了结缔组织膜的肝门静脉管处插入, 使针头前端稍离肝门静脉入肝分支部。用事先准备好的棉纱线扎好, 以防漏血和针管滑出。用经无菌过滤, 37℃ 恒温和混合气体 (95% O_2 , 5% CO_2) 饱和的 pH 7.2—7.4 无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}